

## ⑪ 公開特許公報 (A) 平2-25447

⑫ Int. Cl.<sup>5</sup>

C 07 C	57/03
	51/43
	51/44
	51/47
C 11 C	3/00
C 12 P	7/64
//(C 12 P	7/64
C 12 R	1:72)

識別記号

府内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)1月26日

7457-4H
7327-4H
7327-4H
7327-4H
7106-4H
6926-4B
6712-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 高度不飽和脂肪酸類の製造方法

⑮ 特 願 昭63-172691

⑯ 出 願 昭63(1988)7月13日

⑰ 発明者 橋爪論	茨城県つくば市春日2丁目20番3号
⑰ 発明者 田中幸久	茨城県つくば市天久保2丁目6番3号
⑰ 発明者 大口寿恵	茨城県つくば市天久保3丁目12番3号
⑰ 発明者 野口泰久	茨城県北相馬郡藤代町宮和田531番地
⑰ 発明者 船田正	茨城県つくば市梅園2丁目24番5号
⑰ 出願人 日本油脂株式会社	東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
⑭ 代理人 弁理士舟橋栄子	

## 明細書

## 1. 発明の名称

高度不飽和脂肪酸類の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

魚油をキャンディダ (Candida) 族菌由来のリバーゼにより加水分解し、得られた分解混合物を脂肪酸とグリセリドとに分離し、これらの各成分について低級アルキルエステル化し、ついで尿素付加法により高度不飽和脂肪酸成分を濃縮し、さらに分子蒸留法、超臨界炭酸ガス抽出法または液体クロマトグラフィー法のいずれかの方法を用いて濃縮精製することにより、上記脂肪酸成分からエイコサペンタエン酸またはそのエステルを、上記グリセリド成分からドコサヘキサエン酸またはそのエステルを得ることを特徴とする高度不飽和脂肪酸類の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、高純度のエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸またはそれらの低級アルキルエ

ステル類の新しい濃縮分離方法に関する。

## (従来の技術)

エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエンは、生体内の重要な生理活性物質であるⅢ型のプロスタグランジンなどへの変換が予想され、各種の生理活性能を発現することが知られている。特にエイコサペンタエン酸には、血小板の凝集を阻害し、血中コレステロール値、中性脂質値を下げる働きがあり、高血圧症、高コレステロール血症、脳血栓、あるいは心筋梗塞などに効果があることが知られている。又ドコサヘキサエン酸にもエイコサペンタエン酸と同様の働きがあることが知られているが、そのほかにドコサヘキサエン酸は脳や目の網膜に多く含まれており、その機能が注目されている。

このようにエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸は重要な脂質成分であり、その利用も医薬、健康食品などとして色々考えられ、高濃度の精製品の開発が期待されている。

エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸の

生化学的価値が認められているにもかかわらず、これらの化学合成は極めて困難であるため、天然の原料から抽出、精製することが行われている。例えば尿素付加法、分子蒸留法、超臨界炭酸ガス抽出法、液体クロマトグラフィー法等が個々に実施されている。

(発明が解決しようとする課題)

魚油はエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸を多く含む天然油脂であるが、魚油中にはその他の脂肪酸類も多く含まれているため、エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸とを高純度で分取するには、かなりの技術を要する。その理由として、魚油中にはエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の類似物が含まれており、それらがエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸と類似挙動を起こすため、これらの分取が困難であった。

また、エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸も互いに似た挙動を示すため、従来からある分取型高速液体クロマトグラフィーでは、魚油を

原料としてエイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸とを大量に高濃度で濃縮することは、原料組成が複雑なため、コスト的に問題があった。

また、従来からの蒸留法などでも、同様に原料組成が複雑なため、收率の低下が生じていた。

本発明は、上記課題を解決するもので、安価で入手しやすい天然原料である魚油から、簡単な操作によりエイコサペンタエン酸またはドコサヘキサエン酸あるいはそれらのエステル類を濃縮分離する方法を提供することを目的としている。

(課題を解決するための手段)

本発明は、魚油をキャンディダ (*Candida*) 族由来のリバーゼにより加水分解し、得られた分解混合物を脂肪酸とグリセリドとに分離し、これらの各成分について低級アルキルエステル化し、ついで尿素付加法により高度不飽和脂肪酸成分を濃縮し、さらに分子蒸留法、超臨界炭酸ガス抽出法または液体クロマトグラフィー法のいずれかの方法を用いて濃縮精製することにより、上記脂肪酸成分からエイコサペンタエン酸またはそのエステ

ルを、上記グリセリド成分からドコサヘキサエン酸またはそのエステルを得ることを特徴とする高度不飽和脂肪酸類の製造方法である。

本発明において原料に用いる魚油は特に制限はないが、俗に青みの魚といわれているイワシ、サバ、サンマ、カツオ、マグロなどが好ましい。一般にこれらの油脂の脂肪酸組成は C<sub>14:0</sub> : 5.9 %、C<sub>16:0</sub> : 15.9 %、C<sub>18:1</sub> : 6.6 %、C<sub>18:0</sub> : 2.5 %、C<sub>18:1</sub> : 13.6 %、C<sub>18:2</sub> : 1.2 %、C<sub>18:4</sub> : 2.5 %、C<sub>20:1</sub> : 8.6 %、C<sub>20:4</sub> : 0.9 %、エイコサペンタエン酸 : 12.9 %、C<sub>22:1</sub> : 7.8 %、C<sub>22:5</sub> : 1.9 %、ドコサヘキサエン酸 : 8.8 %、C<sub>24:1</sub> : 1.0 %、その他約10 %であるが、この数値は魚種、季節、産地によりいろいろ異なる。

本発明者らは、このような組成を持つ魚油からエイコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸あるいはそれらのエステルを効率よく取り出すために、以下のような手段を見出した。

まず魚油を、ドコサヘキサエン酸を加水分解しにくい特性を持つキャンディダ (*Candida*) 族由来

リバーゼで加水分解すると、ドコサヘキサエン酸を高濃度に含有するグリセリドと、エイコサペンタエン酸を多く含有する脂肪酸の混合物を得ることができる。ついでこの分解混合物を脂肪酸成分とグリセリド成分とに分離する。すなわち、混合物にエタノールとヘキサンと水を加え分層させ、これに水酸化ナトリウムの水溶液を滴下して、水層側へエイコサペンタエン酸を高濃度に含む脂肪酸をナトリウム塩として溶かし出し、後に塩酸等で脂肪酸に戻す。他方、ヘキサン層から回収したドコサヘキサエン酸を高濃度に含有するグリセリド画分を、水酸化ナトリウムによりケン化分解し、塩酸で脂肪酸に戻した脂肪酸混合物を得る。

ついで上記の各々の成分について低級アルコール中で少量の触媒（塩酸、硫酸等）の存在下でエステル化して脂肪酸低級アルキルエステルを得る。

また、上記のグリセリド画分を低級アルコール中で少量の触媒（ナトリウムメチラート、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等）の存在下でアルカリシスして同様に脂肪酸低級アルキルエステル

を得る。

ついで尿素付加法により、これらの成分から高度不飽和脂肪酸成分を濃縮する。尿素付加法は尿素と結晶性付加物を形成させることによって直鎖状炭化水素、脂肪酸、アルコール類を分離、分別する方法である。一般に油脂化学の分野では、飽和またはモノエンの脂肪酸が尿素と結晶性付加物を形成することを利用し、高度不飽和脂肪酸の濃縮などに用いられる。尿素付加物を生成させるには、例えば試料に対して2~4倍量(W:W)の尿素を、6~10倍量メタノールに加熱下溶解しておき、これに試料を加え攪拌する。5~30℃まで冷却して飽和またはモノエンの脂肪酸を結晶化させ、濾過、洗浄の後、目的とする高度不飽和脂肪酸を分離する。

本発明においては上記の工程の後、さらに分子蒸留法、超臨界炭酸ガス抽出法または液体クロマトグラフィー法のいずれかの方法を用いて濃縮精製工程を実施する。

分子蒸留法は、低級アルコールのエ斯特ルと成

した脂肪酸エ斯特ルを、 $1 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-2}$  mmHgに減圧下、100~150℃に加熱し、各脂肪酸エ斯特ルの沸点の差を利用して分離する方法である。この工程を複数回くりかえすと、より高純度の製品が得られる。

超臨界炭酸ガス抽出法は、炭酸ガスを温度31.1~100℃、圧力75.2~200 kg/cm<sup>2</sup>で超臨界状態にし、各脂肪酸エ斯特ルの超臨界炭酸ガスへの溶解度の差により抽出分別する方法である。

液体クロマトグラフィー法は、通常の液体クロマトグラフィーあるいはオープンカラムのクロマトグラフィー等があり、溶離液としてはヘキサン、ヘキサン/アセトン、ヘブタン、オクタン、イソオクタン等が使用でき、カラム充填材としてはステアリルメタクリレートポリマーゲル、ステレンジビニルベンゼンポリマーゲル、メタクリル酸メチル-エチレングリコールジメタクリレートポリマーゲル等が使用できる。他にカラム充填材を用いない遠心液クロマトグラフィーがある。

遠心液クロマトグラフィーは、液体混合物の

原液に比重の異なる2種の溶剤を作用させて、混合物の中のある特定の物質を他の物質から分離する方法である。液々抽出の特徴は原液と溶剤の二層を形成して、この二層を比重の差により分離することであって、遠心力を用いて短時間で希望する物質を選択的に溶剤層に移動分離することができる。魚油の分解物の精製には、n-ヘキサンを移動相、アセトニトリルまたは90%エタノールを固定相とし、移動相で溶出する成分を正溶出画分とし、送液方向を反転し固定相を送液して固定相内に残留する成分を反転溶出画分とする。なお、本発明の実施例では、遠心液分配クロマトグラフモデルCPC-LLN(三鬼エンジニアリング㈱)を用い、分配カートリッジ250W型を使用して回転数700~900、送液速度1.0~3.0 mlで分離した。

#### (発明の効果)

本発明のように魚油を原料として、特定のリバーゼでエイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸を選択加水分解し、分離処理を行うことにより、

直接加水分解して得られた原料と比較して、エイコサペンタエン酸またはドコサヘキサエン酸の高純度濃縮に有利な中間原料が得られるようになり、また、従来では同一の原料からエイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸を濃縮するには複雑な分離工程が必要であったが、本発明のように特定の濃縮工程を組み合わせることにより、高純度エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸とを別々に大量に得ることが可能となった。本法により安価な魚油より高純度エイコサペンタエン酸またはドコサヘキサエン酸を大量に簡単に得られることができるるので、試薬、医薬、健康食品などの素材として、安価に供給することができる。

#### (実施例)

以下、実施例に基づいて本発明を具体的に説明する。

#### 実施例1

魚油5kgと水2.5kgを30L容量の反応釜に入れ、5000ユニットのキャンディダ・シリンドラセ(Candida cylindracea)由来リバーゼを500ml

の水に溶かしたものと加え、37℃に保温しながら回転攪拌し24時間反応させた。分解物にヘキサン11mlを加え分離させ、下層を抜き去った後、ヘキサン層を温水で洗い酵素を洗い落とした。これにエタノール5.2mlと水2mlを加え、さらに1Nの水酸化ナトリウム水溶液11.5mlを滴下攪拌後、静置して上層からグリセリド画分880gを得た。下層は塩酸を加えて脂肪酸を遊離させ、3550gの脂肪酸画分を得た。

それぞれの画分中のエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度は、ガスクロマトグラフィーによる分析の結果、グリセリド画分がエイコサペンタエン酸5.2%、ドコサヘキサエン酸40.7%、脂肪酸画分がエイコサペンタエン酸15.6%、ドコサヘキサエン酸1.3%であった。

グリセリド画分500gに500gのエタノールと5gの水酸化カリウムを加え、リフラックス下2時間エステル交換し、塩酸で中和し水洗後、脂肪酸エステルを1.5mlのヘキサンで抽出した。ロータリーエバボレータで脱溶媒後、460gの脂肪酸エステ

ルを回収した。その中から脂肪酸エステル200g、尿素800gおよびヘキサン1600ml、メタノール48mlを攪拌機の付いたフラスコに仕込み、2時間室温で攪拌しながら反応させた。付加体を濾別、ヘキサンで洗浄し、濾液と洗浄液をロータリーエバボレータで減圧下脱溶剤し、104gの濃縮エステルを得た。

濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸9.1%、ドコサヘキサエン酸72.7%、その他18.2%であった。更にこのうちの52gを分子蒸留 ( $3 \times 10^{-3}$  mmHg、95℃)にかけ、それを2回繰り返すことにより、29.2gの高純度ドコサヘキサエン酸エチルエステル（エイコサペンタエン酸1.3%、ドコサヘキサエン酸97.8%、その他0.9%）を得た。このうちの10gをとり、メタノール50ml、KOH 3g、水0.5gを加え、リフラックス下3時間加水分解し、塩酸で中和後、500mlのヘキサンで抽出し、8.5gの高純度ドコサヘキサエン酸を得た。

### 1 1

また、脂肪酸画分500gに500gのエタノールと硫酸5gを加え、リフラックス下2時間エステル化し、水洗後脂肪酸エステルを1.5mlのヘキサンで抽出した。ロータリーエバボレータで脱溶媒後、440gの脂肪酸エステルを回収した。その中から脂肪酸エステル200g、尿素800gおよびヘキサン1600ml、メタノール48mlを攪拌機の付いたフラスコに仕込み2時間室温で攪拌しながら反応させた。付加体を濾別、ヘキサンで洗浄し、濾液と洗浄液をロータリーエバボレータで減圧下脱溶剤し、50gの濃縮エステルを得た。

濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸60.2%、ドコサヘキサエン酸5.1%、その他34.7%であった。更にこのうちの25gを分子蒸留 ( $3 \times 10^{-3}$  mmHg、95℃)にかけ、それを2回繰り返すことにより、脂肪酸画分から12.3gの高純度エイコサペンタエン酸エチルエ斯特ル（エイコサペンタエン酸94.7%、ドコサヘキサエン酸2.6%、その他2.7%）

### 1 2

を得た。このうちの10gをとり、メタノール50ml、KOH 3g、水0.5gを加え、リフラックス下3時間加水分解し、塩酸で中和後、100mlのヘキサンで抽出し、7.9gの高純度エイコサペンタエン酸を得た。

#### 実施例2

実施例1で得た尿素付加後のドコサヘキサエン酸濃縮エ斯特ル（エイコサペンタエン酸9.1%、ドコサヘキサエン酸72.7%、その他18.2%）52gを液体クロマトグラフィー（ステアリルメタクリレートポリマーゲルカラム、溶離液ヘキサン）で分画し、8.3gの高純度ドコサヘキサエン酸エ斯特ル（エイコサペンタエン酸0.8%、ドコサヘキサエン酸98.5%、その他0.7%）を得た。

また、実施例1で得た尿素付加後のエイコサペンタエン酸濃縮エ斯特ル（エイコサペンタエン酸60.2%、ドコサヘキサエン酸5.1%、その他34.7%）25gを液体クロマトグラフィー（ステアリルメタクリレートポリマーゲルカラム、溶離液ヘキサン）で分画し、5.6gの高純度エイコサペンタエ

### 1 3

### 1 4

ン酸エチルエステル（エイコサベンタエン酸97.7%、ドコサヘキサエン酸1.1%、その他1.2%）を得た。

#### 実施例3

実施例1と同様に魚油をリバーゼで分解した後、400gの分解物にヘキサン880mlを加え分層させ、下層を抜き去った後、ヘキサン層を温水で洗い酵素を洗い落とした。これにエタノール420mlと水160mlを加え、更に1Nの水酸化ナトリウム水溶液920mlを滴下攪拌後静置して上層からグリセリド画分70gを得た。下層は塩酸で中和し、遊離した脂肪酸画分305gを得た。

それぞれの画分中のエイコサベンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、グリセリド画分がエイコサベンタエン酸4.8%、ドコサヘキサエン酸38.8%、脂肪酸画分がエイコサベンタエン酸14.7%、ドコサヘキサエン酸2.0%であった。

グリセリド画分50gに50gのエタノールと0.5gの水酸化カリウムを加え、リフラックス下2時間

エステル交換し、塩酸で中和し水洗後、脂肪酸エステルを150mlのヘキサンで抽出した。ロータリーエバボレータで脱溶媒後、45gの脂肪酸エステルを回収した。その中から脂肪酸エステル10g、尿素40gおよびヘキサン80ml、メタノール2.4mlを攪拌機の付いたフラスコに仕込み、2時間室温で攪拌しながら反応させた。付加体を濾別、ヘキサンで洗浄し、濾液と洗浄液をロータリーエバボレータで減圧下脱溶剤し、5.1gの濃縮エステルを得た。

濃縮エステルのエイコサベンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサベンタエン酸8.7%、ドコサヘキサエン酸69.9%、その他21.4%であった。これを更に遠心液クロマトグラフィー（分配液n-ヘキサン：90%エタノール=1:1、操作温度20℃、回転数800rpm）で分画し、2.8gの高純度ドコサヘキサエン酸エチルエステル（エイコサベンタエン酸0.9%、ドコサヘキサエン酸95.8%、その他3.3%）を得た。

#### 15

脂肪酸画分50gに50gのエタノールと0.5gの硫酸を加え、リフラックス下2時間エステル化し、水洗後、脂肪酸エステルを150mlのヘキサンで抽出した。ロータリーエバボレータで脱溶媒後、40gの脂肪酸エステルを回収した。その中から脂肪酸エステル10g、尿素40gおよびヘキサン80ml、メタノール2.4mlを攪拌機の付いたフラスコに仕込み、2時間室温で攪拌しながら反応させた。付加体を濾別、ヘキサンで洗浄し、濾液と洗浄液をロータリーエバボレータで減圧下脱溶剤し、2.6gの濃縮エステルを得た。

濃縮エステルのエイコサベンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度は、ガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサベンタエン酸58.6%、ドコサヘキサエン酸4.5%、その他36.9%であった。これを更に遠心液クロマトグラフィー（分配液n-ヘキサン：90%エタノール=1:1、操作温度20℃、回転数800rpm）で分画し、1.7gの高純度エイコサベンタエン酸エチルエステル（エイコサベンタエン酸93.3%、ドコサヘキサエン酸

#### 16

4.9%、その他1.8%）を得た。

#### 実施例4

魚油5kgと水2.5kgを30L容量の反応釜に入れ、1000ユニットの実施例1と同じリバーゼを500mlの水に溶かしたものと加え、37℃に保温しながら回転攪拌し、6時間反応させた。分解物にヘキサン11Lを加え分層させ、下層を抜き去った後、ヘキサン層を温水で洗い酵素を洗い落とした。これにエタノール5.2Lと水2Lを加え、更に1Nの水酸化ナトリウム水溶液7.5Lを滴下攪拌後、静置して、上層からグリセリド画分1800gを得た。下層は塩酸を加えて脂肪酸を遊離させ、2250gの脂肪酸画分を得た。

それぞれの画分中のエイコサベンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、グリセリド画分がエイコサベンタエン酸16.2%、ドコサヘキサエン酸21.5%、脂肪酸画分がエイコサベンタエン酸9.8%、ドコサヘキサエン酸1.9%であった。

このうちグリセリド画分500gを実施例1と同様

#### 17

#### 18

の方法でエチルエステル化し、440gのエステルを得た。このエステル100gを実施例1と同様の方法で尿素付加し、濃縮エステルを43g回収した。濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸33.2%、ドコサヘキサエン酸46.1%、その他20.7%であった。更にこれを超臨界炭酸ガス抽出法(55℃、120kg/cm<sup>2</sup>)を用いて分画し、19.5gの高純度ドコサヘキサエン酸エチルエステル(エイコサペンタエン酸7.5%、ドコサヘキサエン酸88.2%、その他3.3%)を得た。

また、脂肪酸画分500gを実施例1と同様の方法でエチルエステル化し、430gのエステルを得た。このエステル100gを実施例1と同様の方法で尿素付加し、濃縮エステルを19.6g回収した。濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸45.9%、ドコサヘキサエン酸8.7%、その他45.4%であった。更にこ

れを超臨界炭酸ガス抽出法(55℃、120kg/cm<sup>2</sup>)を用いて分画し、9.5gの高純度エイコサペンタエン酸エチルエステル(エイコサペンタエン酸82.3%、ドコサヘキサエン酸3.4%、その他14.3%)を得た。

#### 実施例5

実施例4と同様に魚油を分解した後、400gの分解物にヘキサン880mlを加え分層させ、下層を抜き去った後、ヘキサン層を温水で洗い酵素を洗い落とした。これにエタノール420mlと水160mlを加え、更に1Nの水酸化ナトリウム水溶液920mlを滴下攪拌後、静置して、上層からグリセリド画分140gを得た。下層は塩酸で中和し、遊離した脂肪酸画分160gを得た。それぞれの画分中のエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、グリセリド画分がエイコサペンタエン酸15.5%、ドコサヘキサエン酸20.8%、脂肪酸画分がエイコサペンタエン酸10.6%、ドコサヘキサエン酸1.5%であった。

このうちグリセリド画分50gを実施例3と同様の方法でエチルエステル化し、43gのエステルを得た。このエステル10gを実施例3と同様に尿素付加し、4.2gのドコサヘキサエン酸濃縮エステルを得た。濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸31.5%、ドコサヘキサエン酸44.8%、その他23.7%であった。全量の濃縮エステルを、200mlのスチレンジビニルベンゼン共重合体樹脂を充填したオーブンカラムでヘキサン/アセトン=8/2の混合溶媒を用いて精製し、0.8gの高純度ドコサヘキサエン酸エチルエステル(エイコサペンタエン酸1.3%、ドコサヘキサエン酸93.3%、その他5.4%)を得た。

また、脂肪酸画分50gを実施例3と同様の方法でエチルエステル化し、41gのエステルを得た。このエステル10gを実施例2と同様の方法で尿素付加し、2.3gのエイコサペンタエン酸濃縮エステルを得た。濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、

ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸43.9%、ドコサヘキサエン酸7.7%、その他48.4%であった。全量の濃縮エステルを、100mlのスチレンジビニルベンゼン共重合体樹脂を充填したオーブンカラムでヘキサン/アセトン=8/2の混合溶媒を用いて精製し、0.3gの高純度エイコサペンタエン酸エチルエステル(エイコサペンタエン酸85.2%、ドコサヘキサエン酸2.5%、その他12.3%)を得た。

#### 比較例1

魚油500gをエタノール500g、KOH500gで実施例1と同様の方法でエチルエステル化し、470gのエステルを得た。そのうちの100gを実施例1と同様の方法で尿素付加し、濃縮エステルを28.1g回収した。濃縮エステルのエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサペンタエン酸42.9%、ドコサヘキサエン酸25.3%、その他32.7%であった。

これを実施例 1 と同条件下で 2 回繰り返し分子蒸留し、9.5g のドコサヘキサエン酸画分（エイコサベントエン酸28.4%、ドコサヘキサエン酸46.4%、その他25.2%）を得た。

また、実施例 1 と同条件下で 2 回繰り返し分子蒸留し、11.3g のエイコサベントエン酸画分（エイコサベントエン酸74.3%、ドコサヘキサエン酸18.6%、その他7.1%）を得た。

キャンディダ族菌由来のリバーゼによる処理をしないので、実施例 1 に比して目的物の純度が低いことがわかる。

#### 比較例 2

魚油 5 kg と水2.5 kg を30 ℥ 容量の反応釜に入れ、5000ユニットのクロモバクテリウム由来リバーゼを500 ℥ の水に溶かしたものと加え、37℃に保温しながら回転攪拌し24時間反応させた。分解物を実施例 1 と同様の方法で脂肪酸とグリセリドに分画し、グリセリド画分790g と脂肪酸画分3680 gを得た。

それぞれの画分中のエイコサベントエン酸、ド

コサヘキサエン酸濃度は、ガスクロマトグラフィーによる分析の結果、グリセリド画分がエイコサベントエン酸10.5%、ドコサヘキサエン酸10.3%、脂肪酸画分がエイコサベントエン酸16.3%、ドコサヘキサエン酸7.6% であった。

グリセリド画分700g を実施例 1 と同様の方法でエチルエステル化し、664g の脂肪酸エステルを回収した。その中から脂肪酸エステル400g を取り、実施例 1 と同様の方法で尿素付加し、117g の濃縮エステルを得た。濃縮エステルのエイコサベントエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度はガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサベントエン酸30.3%、ドコサヘキサエン酸27.2%、その他42.5% であった。このうち50g を実施例 1 と同条件下で 2 回繰り返し分子蒸留し、15.2g のドコサヘキサエン酸画分（エイコサベントエン酸31.2%、ドコサヘキサエン酸35.4%、その他33.4%）を得た。

また脂肪酸画分1000g を実施例 1 と同様の方法でエチルエステル化し916g の脂肪酸エステルを回

2 3

2 4

取した。その中から脂肪酸エステル400g を取り、実施例 1 と同様の方法で尿素付加し108g の濃縮エステルを得た。濃縮エステルのエイコサベントエン酸、ドコサヘキサエン酸濃度は、ガスクロマトグラフィーによる分析の結果、エイコサベントエン酸38.3%、ドコサヘキサエン酸32.4%、その他29.3% であった。このうち50g を実施例 1 と同条件下で 2 回繰り返し分子蒸留し、12.3g のエイコサベントエン酸画分（エイコサベントエン酸36.8%、ドコサヘキサエン酸32.4%、その他30.8%）を得た。キャンディダ族菌由来のリバーゼによる処理をしないので、実施例 1 に比して目的物の純度が低いことがわかる。

#### 比較例 3

比較例 2 で得た尿素付加後のドコサヘキサエン酸濃縮エステル50g を液体クロマトグラフィー（ステアリルメタクリレートポリマー・ゲルカラム、溶離液ヘキサン）で分画し、2.8g のドコサヘキサエン酸エチルエステル（エイコサベントエン酸12.5%、ドコサヘキサエン酸62.3%、その他25.3%）

を得た。

また、比較例 2 で得た尿素付加後のエイコサベントエン酸濃縮エステル50g を、液体クロマトグラフィー（ステアリルメタクリレートポリマー・ゲルカラム、溶離液ヘキサン）で分画し、1.2g のエイコサベントエン酸エチルエステル（エイコサベントエン酸65.8%、ドコサヘキサエン酸20.0%、その他14.2%）を得た。

特許出願人 日本油脂株式会社  
代理人 弁理士 舟橋栄子



2 5

2 6